

SVEUČILIŠTE JOSIPA JURJA STROSSMAYERA U OSIJEKU
PREHRAMBENO-TEHNOLOŠKI FAKULTET OSIJEK

Ivana Buljeta

**Utjecaj karakteristika namjenskih sortnih grupa ječma na stupanj
razgradnje β -glukana tijekom slađenja**

DIPLOMSKI RAD

Osijek, rujan, 2018.

TEMELJNA DOKUMENTACIJSKA KARTICA

DIPLOMSKI RAD

Sveučilište Josipa Jurja Strossmayera u Osijeku
Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek
Zavod za Procesno inženjerstvo
Katedra za Bioproceno inženjerstvo
Franje Kuhača 20, 31000 Osijek, Hrvatska

Diplomski sveučilišni studij Prehrambeno inženjerstvo

Znanstveno područje: Biotehničke znanosti

Znanstveno polje: Prehrambena tehnologija

Nastavni predmet: Tehnologija slada i piva

Tema rada je prihvaćena na X. redovitoj sjednici Fakultetskog vijeća Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek u akademskoj godini 2016./2017. održanoj 13. srpnja 2017.

Mentor: doc. dr. sc. Kristina Mastanjević

Komentor: dr. sc. Daniela Horvat, znan. savj.

Utjecaj karakteristika namjenskih sortnih grupa ječma na stupanj razgradnje β -glukana tijekom slađenja Ivana Buljeta, 387-DI

Sažetak:

U radu je određena koncentracija β -glukana u uzorcima ječma, slada i sladovine, te viskoznost sladovine. Ukupno je laboratorijski analizirano 25 uzoraka ječma. Uzorci ječma su postupkom mikroslađenja prevedeni u slad, a nakon toga kongresnom metodom ukomljavanja od slada je dobivena sladovina. Zbog problema uzrokovanih β -glukanima u proizvodnji piva, potrebno je ustanoviti promjenu koncentracije β -glukana tijekom slađenja. Pivarska sorta jarog ječma Pivarac je pokazala značajno smanjenje koncentracije β -glukana nakon slađenja. Sve jare sorte (osim sorte Matej) i kontrolne sorte daju sladovine s preporučenom koncentracijom β -glukana (220 mg/L). Vrijednosti koncentracije β -glukana u sladovini ozimih sorti su veće od preporučenih. Najmanje vrijednosti viskoznosti sladovine su uočene kod kontrolnih sorti Tiffany i Vanessa, te kod pivarske sorte Pivarac.

Ključne riječi: sorte ječma, β -glukani, mikroslađenje

Rad sadrži: 44 stranica
16 slika
08 tablica
00 priloga
34 literaturnih referenci

Jezik izvornika: Hrvatski

Sastav Povjerenstva za ocjenu i obranu diplomskog rada i diplomskog ispita:

- | | |
|--|---------------|
| 1. prof. dr. sc. Vinko Krstanović | predsjednik |
| 2. doc. dr. sc. Kristina Mastanjević | član-mentor |
| 3. dr. sc. Daniela Horvat, znan.savje. | član |
| 4. izv. prof. dr. sc. Natalija Velić | zamjena člana |

Datum obrane: 28. rujna 2018.

Rad je u tiskanom i elektroničkom (pdf format) obliku pohranjen u Knjižnici Prehrambeno-tehnološkog fakulteta Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

BASIC DOCUMENTATION CARD

GRADUATE THESIS

University Josip Juraj Strossmayer in Osijek
Faculty of Food Technology Osijek
Department of Process Engineering
Subdepartment of Bioprocess Engineering
Franje Kuhača 20, HR-31000 Osijek, Croatia

Graduate program of Food engineering

Scientific area: Biotechnical sciences

Scientific field: Food technology

Course title: Malt and beer technology

Thesis subject was approved by the Faculty of Food Technology Osijek Council at its session no. X held on July 13, 2017.

Supervisor: Kristina Mastanjević, PhD, assist.prof

Co-supervisor: Daniela Horvat, PhD, science advisor

The impact of the different varietal groups of barley on the degree of decomposition β -glucans during malting

Ivana Buljeta, 387-DI

Summary:

This paper investigated the concentration of β -glucans in barley samples, malt and wort, and the viscosity of wort. A total of 25 samples of barley have been analysed in the laboratory. Barley samples have been micro-malted, and after that congress method of mashing has been applied on all of the samples. Due to the problems caused by β -glucans in the production of beer, it is necessary to determine the change of β -glucans concentrations during malting and brewing. Brewing variety „Pivarac“ has showed a significant reduction in β -glucans concentration after malting. All of the spring varieties (except „Matej“) and control variety gave worts with recommended or little less under recommended concentrations of β -glucans (220 g/ml). On the other hand the values of β -glucans concentrations in winter cultivars were higher than recommended. Tiffany, Vanessa and brewing variety Pivarac showed the lowest viscosity value for wort.

Key words: barley varieties, β -glucans, micro-malting

Thesis contains: 44 pages
16 figures
08 tables
00 supplements
34 references

Original in: Croatian

Defense committee:

- | | |
|--|--------------|
| 1. Vinko Krstanović, PhD, assoc.prof | chair person |
| 2. Kristina Mastanjević, PhD, assist.prof. | supervisor |
| 3. Daniela Horvat, PhD, science advisor | member |
| 4. Natalija Velić, PhD, assoc.prof. | stand-in |

Defense date: September 28, 2018.

Printed and electronic (pdf format) version of thesis is deposited in Library of the Faculty of Food Technology Osijek, Franje Kuhača 20, Osijek.

Najiskrenije se zahvaljujem mentorici doc. dr. sc. Kristini Mastanjević na razumijevanju i pomoći prilikom izrade diplomskog rada. Zahvaljujem se prof. dr. sc. Vinku Krstanović na korisnim savjetima tijekom izrade diplomskog rada. Također, zahvaljujem se znanstvenicima Poljoprivrednog instituta Osijek na stručnoj i praktičnoj pomoći tijekom odrađivanja eksperimentalnog dijela diplomskog rada.

Posebnu zahvalnost iskazujem svojim roditeljima i bratu koji su svih ovih godina bili moj oslonac, te mi omogućili školovanje.

Sadržaj

1. UVOD	1
2. TEORIJSKI DIO	3
2.1. JEČAM	4
2.1.1. Građa zrna ječma.....	6
2.1.2. Kemijski sastav zrna ječma	8
2.2. β-GLUKANI.....	10
2.2.1. β -glukani u pivarstvu	11
2.3. SLAD	12
2.3.1. Odabir ječma za slađenje.....	12
2.3.2. Proizvodnja slada	12
2.3.3. Svojstva i tipovi slada.....	14
3. EKSPERIMENTALNI DIO	15
3.1. ZADATAK.....	16
3.2. MATERIJAL I METODE	16
3.2.1. Mikroslađenje.....	18
3.2.2. Kongresna metoda ukomljavanja	20
3.2.3. Određivanje viskoznosti	21
3.2.4. Određivanje β -glukana	22
4. REZULTATI I RASPRAVA	26
4.1. REZULTATI	27
4.2. OBRADA REZULTATA	30
5. ZAKLJUČCI	39
6. LITERATURA	41

Popis ilustracija

Slika 1 Prikaz položaja zrna kod dvorednih i šesterorednih tipova ječma (Magdić, 2017.)	5
Slika 2 Uzdužni presjek zrna ječma (Stepanović, 2014.)	7
Slika 3 Struktura (1,3),(1,4)- β -D glukana ječma (VitaminPROS, 2017.)	10
Slika 4 Priprema ječma za mikroslađenje	20
Slika 5 Uređaj na kojem se provodi kongresna metoda ukomljavanja slada	21
Slika 6 Filtracija dobivene sladovine	21
Slika 7 Uzimanje uzorka za mjerenje viskoznosti kongresne sladovine	22
Slika 8 Viskoznost sladovine kod pojedinih uzoraka	30
Slika 9 Viskoznost sladovine kod različitih sortnih skupina	31
Slika 10 Udio β -glukana u uzorcima ječma i slada	32
Slika 11 Prosječni udio β -glukana u stočnim, pivarskim i višenamjenskim sortama ječma i slada	33
Slika 12 Prosječni udio β -glukana u uzorcima ječma i slada s obzirom na vrijeme sjetve	34
Slika 13 Udio β -glukana u sladovini pojedinih uzoraka	35
Slika 14 Prosječni udio β -glukana u stočnim, pivarskim i višenamjenskim sortama sladovine	36
Slika 16 Ovisnost viskoznosti i udjela β -glukana u sladovini	38

Popis tablica

Tablica 1 Kemijski sastav suhe tvari zrna ječma (Lásztity, 1999.)	8
Tablica 2 Procesni parametri u različitim fazama slađenja (Schuster i sur. 1988.)	13
Tablica 3 Pokazatelji kakvoće svijetlog tipa slada (Marić, 2000.)	14
Tablica 4 Uzorci ječma za slađenje i analizu slada	17
Tablica 5 Procesni parametri mikroslađenja	19
Tablica 6 Rezultati analiza, uzorci od 1 do 11	27
Tablica 7 Rezultati analiza, uzorci od 12 do 25	28
Tablica 8 Prosječni udjeli i prosječna razlika mase β -glukana u ječmu, sladu i sladovini po namjenskim sortnim grupama	29

Popis oznaka, kratica i simbola

S	stočna sorta
P	pivarska sorta
P/S	pivarsko-stočna sorta (višenamjenska sorta)
FAO	Organizacija za hranu i poljoprivredu
EBC	Europska pivarska konvencija
s.t.	suha tvar

1. UVOD

Ječma je osnovna sirovina za proizvodnju slada za potrebe proizvodnje piva. Glavni neškrobni polisaharid ječma je grupa spojeva koje nazivamo β -glukani. Sastavljeni su od jedinica glukoze, povezanih s β -(1,3) i (1,4)-D glikozidnim vezama, a nalaze se u hemicelulozi endosperma (u omjeru 30 % : 70 %), poglavito u staničnim stjenkama. Tijekom slađenja β -glukani se djelomično razgrađuju, ali se ne mogu eliminirati tijekom procesa slađenja. Povišen udjel ovih spojeva u endospermu zrna rezultira i povišenim udjelom njihovih topljivih frakcija, što za posljedicu ima negativan učinak na kakvoću sladovine i posljedično piva jer stvaraju gel prilikom hidrolize sastojaka slada u varionici. Ovo se odražava kao otežana citoliza, smanjena friabilnost, filtrabilnost i koloidna stabilnost piva, umanjen udjel ekstrakta, te ometanje normalnog vrenja sladovine. Sve navedeno dovodi do povećanja proizvodnih troškova. Zbog toga je važno da u proizvodnji piva tj. u sladu sadržaj β -glukana bude što manji. Najbolji način za postizanje ovog cilja je proizvodnja slada od sorti ječma koje imaju niži polazni udjel β -glukana u zrnu. Međutim, sam ukupan udjel β -glukana u zrnu nije pouzdan pokazatelj sladarske kakvoće jer problem predstavljaju topljivi β -glukani koji završavaju u sladovini i potom prelaze u pivo. Cilj ovog rada je iz dostupnog domaćeg sortimenta ječma proizvesti sladove i od njih odgovarajuće sladovine u kojima će se odrediti koncentracije ukupnih i topljivih β -glukana te ustanoviti korelacijska veza početne koncentracije β -glukana u sladu i koncentracije β -glukana u sladovini. Dobiveni rezultati će dati točniju sliku pivarske kakvoće ispitivanog sortimenta ječma.

2. TEORIJSKI DIO

2.1. JEČAM

Ječam pripada jednoj od najstarijih ratarskih kultura čija je prvenstvena uloga bila ishrana ljudi, ali danas se uglavnom koristi u industriji piva za proizvodnju slada, te u ishrani stoke. Izvorno područje uzgoja i najvjerojatnije mjesto podrijetla ječma se smatra plodni polumjesec Bliskog istoka (Turska, Iran i Libanon). Ova strna žitarica uspijeva i u hladnijim krajevima i to je jedan od razloga zbog kojeg zauzima visoko mjesto u proizvodnji. U ukupnoj svjetskoj proizvodnji žitarica, ječam se nalazi na četvrtom mjestu nakon riže, pšenice i kukuruza. Približno 60 % ukupne svjetske proizvodnje ječma se proizvodi u Europi (Šimić, 2009.).

Prema podacima FAO-a iz 2014. godine u svijetu je na približno 50 milijuna ha zemlje proizvedeno oko 144 milijuna tona ječma. Najveći proizvođači ječma današnjice su: Rusija, Francuska, Njemačka, Australija, Ukrajina, Kanda, Španjolska, Turska, USA, UK. Od ukupne svjetske proizvodnje u Rusiji se proizvodi oko 14 % ječma. Najveći prinosi po hektaru su zabilježeni u Francuskoj i Njemačkoj (Akar i sur., 2004.).

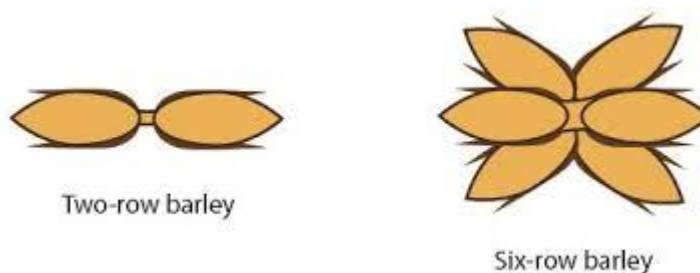
Prema botaničkim svojstvima, ječam pripada porodici *Poaceae*, odjelu *Triticeae*, pododjelu *Hordeinae* i rodu *Hordeum* koji obuhvaća oko 25 vrsta. Vrste *Hordeum vulgare* pripadaju svi kultivirani oblici ječma.

Spomenuta vrsta se prema razvijenosti, rasporedu i fertilnosti klasića dijeli u pet suvarijeteta:

- *Hordeum vulgare*, convar. *hexastichon* (višeredni ječam),
- *Hordeum vulgare*, convar. *intermedium* (prijelazni ječam),
- *Hordeum vulgare*, convar. *distichon* (dvoredni ječam),
- *Hordeum vulgare*, convar. *dificiens* (nepotpuni ječam),
- *Hordeum vulgare*, convar. *labile-irregulare* (labilni ječam) (Mansfeld, 1950.).

Suvarijeteti dvorednog i šesterorednog ječma imaju najveći značaj u oplemenjivanju i proizvodnji ječma. Divlji dvoredni ječam – *Hordeum spontaneum* smata se izvornim oblikom u razvoju kulturnog ječma. Iz njega je prvobitno nastao dvoredni kulturni ječam *Hordeum vulgare* convar. *distichon*, te nakon toga višeredni ječam, *Hordeum vulgare* convar. *hexastichon* (Šimić, 2009.).

Po poprečnom presjeku klasa moguće je odrediti o kojem se timu ječma radi. Ako na istim visinama klasa dolazi 6 zrna, ona su poredana u obliku zvijezde tako da se vrhovi zrna nalaze u vrhovima šesterokuta. Postoji ječam četveroredac sa 4 zrna na istoj visini klasa, poredana u smijeru dijagonala četverokuta. Za pivarstvo najveći značaj ima dvoredac koji ima samo dva reda zrna u klasu što mu ostavlja dovoljno prostora za razvoj. Zbog toga ima pravilna, izdužena i jedra zrna što je važno svojstvo pivarskog ječma (Mohaček, 1948.).



Slika 1 Prikaz položaja zrna kod dvorednih i šesterorednih tipova ječma (Magdić, 2017.)

Dvoredne sorte ječma imaju veliko i trbušasto zrno s manjom pljevicom. Zbog toga je u dvorednom ječmu manji sadržaj taninskih i gorkih sastojaka, a postiže se i relativno visok sadržaj ekstrakta. Višeredne sorte ječma imaju neujednačeno zrno zbog manjka prostora, a zrna iz bočnih redova su manja i pri dnu udubljena (Kunze, 1994.). U Hrvatskoj postoji malo sorti koje ispunjavaju zahtjeve u pogledu sladarske kakvoće, tako da su određene stočne sorte označene kao višenamjenske (Krstanović i sur., 2016.). S obzirom na namjenu razlikujemo pivarski (P), stočni (S) i pivarsko-stočni ječam (P/S). Karakteristike dobrog pivarskog ječma su: ujednačena svijetlo-žuta boja zrna, ujednačenost zrna koja je pokazatelj čistoće sorte, zdrava i cijela zrna, bez prisutnosti stranih mirisa, odsustvo svih štetočina (Štefanić i Marić, 1990.).

Jari ječam se sije u razdoblju od ožujka do travnja, dok se ozimi ječam sije od sredine rujna do listopada. Republika Hrvatska se nalazi u južnijem dijelu Europe, te zbog toga ozimi ječam ostvaruje više, sigurnije i stabilnije urode zrna u odnosu na jari ječam zbog boljeg iskorištavanja jesenske i zimske vlage, bolje otpornosti prema suši, odnosno dozrijevanjem prije ljetnih suša. Jari ječam u odnosu na ozimi ima bolju i ujednačeniju kakvoću slada (Kovačević i sur., 1994.; Lalić i Kovačević, 1997.). Kod uzgoja pivarskog ječma potrebno je da se osigura optimalna količina dušika koja neće ograničiti razvoj biljaka, a neće ni dovesti do povećane apsorpcije dušika u zrnu ječma što je direktno povezano sa sadržajem proteina. Sadržaj proteina kod

kvalitetnog pivarskog ječma je 9,50 – 11,5 %. Količina dušika koja se apsorbira uglavnom ovisi o količini dostupnog dušika, sabijanju tla i riziku nedostatka vode tijekom kasnog proljeća (Šimić, 2009.; Mohaček, 1948.). Glavni ciljevi kod oplemenjivanja ječma su povećanje prinosa, nizak sadržaj proteina (ispod 11,5 %) i visok sadržaj kod stočnog ječma (iznad 13 %), visok sadržaj finog ekstrakta (iznad 80 %), otpornost prema dominantnim bolestima i stresnim uvjetima (Pržulj i sur., 2000.; Pržulj i Momčilović, 2006.).

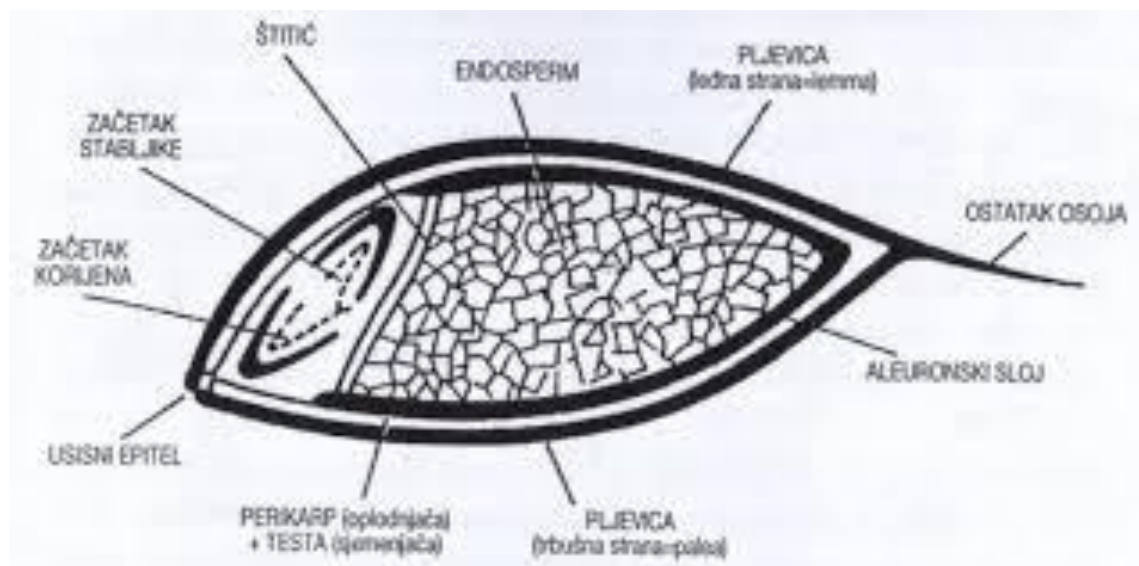
Različitim fizikalno-kemijskim metodama može se utvrditi kakvoća ječma za proizvodnju slada. Osim vanjskih karakteristika, određuje se i masa tisuću zrna, hektolitarska masa, brašnavost, klijavost, hidrosenzibilnost, moć vezivanja vode, vlaga, sadržaj proteina. Dobar pivarski ječam ne smije imati sadržaj brašnavih zrna ispod 80 %. Klijavost predstavlja najznačajniju karakteristiku ječma, a kod pivarskog ječma je potrebna klijavost od najmanje 96 % (Kunze, 1994.; Štefanić i Marić, 1990.).

2.1.1. Građa zrna ječma

Zrno ječma ima duguljasto vretenasti izgled. Na poprečnom presjeku zrna razlikuju se tri osnovna dijela zrna: embrionalni dio, endosperm i omotač zrna.

U embrionalnom dijelu nalazi se embrio sa začecima lisne klice i korjenčića. Procesom klijanja iz embria nastaje nova biljka. Sastavnice koje su neophodne za sintezu hormona i početni rast kod klijanja, a nalaze se u embrionalnom dijelu su: bjelančevine (34 %), topljivi šećeri (20 – 25 %), lipidi (14 - 17 %) i mineralne tvari (5 – 10 %). Embrionalni dio i endosperm su odvojeni tankim slojem štitića i epitelijalnim slojem. Štitić čini poroznu membranu kroz koju se odvija izmjena hranjivih tvari i katalitičkih enzima tijekom klijanja (Gaćeša, 1979.; Marić, 2000.).

Endosperm čini najveći dio zrna, a sastoji se od mnogo stanica koje su ispunjene škrobnim granulama i bjelančevinama. Kada se odvija proces klijanja, endosperm služi embriju kao izvor hranjivih tvari. Endosperm je okružen aleuronskim slojem, a izgrađen je od stanica bogatih proteinima te čini glavno mjesto za biosintezu hidrolitičkih enzima (α -amilaza, β -glukanaza, peptidaza) (Šimić, 2009.).



Slika 2 Uzdužni presjek zrna ječma (Stepanović, 2014.)

Tri su sloja omotača zrna: sjemenjača, perikarp i pljevica. Sjemenjača (testa) nalazi se iznad aleuronskog sloja, a izgrađena je od nekoliko slojeva mrtvih stanica bogatih voskom. Obavija cijelo zrno, te propušta samo čistu vodu. Perikarp (oplođnjača) je sljedeći sloj, a nakon njega je epidermis koji je zaštićen pljevicom s vanjske strane. Pljevica štiti zrno te se sastoji većim dijelom od celuloze i lignina, a manje zastupljeni su pentozani, manani, uronične kiseline, β -glukani i silicij koji joj obezbjeđuje tvrdoću (Marić, 2000.; Gaćeša, 1979.).

2.1.2. Kemijski sastav zrna ječma

Zrno ječma sadrži 12 – 20 % vode i 80 – 88 % suhe tvari, što uveliko ovisi o sorti ječma, klimatskim uvjetima uzgoja, području uzgoja, te vrsti zemljišta.

Tablica 1 Kemijski sastav suhe tvari zrna ječma (Lásztity, 1999.)

Prosječni sastav suhe tvari zrna ječma	(% s.t.)
Ukupni ugljikohidrati	78 – 83
Škrob	51 – 67
Saharoza	1 – 2
Monosaharidi	1 – 2
Arabinoksilani	4 – 8
β-glukani	2,5 – 6,0
Celuloza	2 – 5
Ukupne bjelančevine	8 – 15
Albumini i globulini	1 – 4
Hordeini	3 – 6
Glutelini	3 – 6
Aminokiseline i peptidi	0,5
Ukupni lipidi	2 – 3
Trigliceridi	0,5 – 1,3
Fosfolipidi i glikolipidi	0,5 – 1,3
Voskovi i steroli	0,1 – 0,2
Mineralne tvari	1,9 – 2,5

BJELANČEVINE

Udio bjelančevina u zrnju ječma se kreće od 8 do 13 % (čak i do 16 %). Povećanom gnojdbom dušikom postiže se povećanje udjela bjelančevina u zrnju (Kirkman i sur., 1982.). Trećina proteinskih tvari, koja prijeđe iz ječma u pivo, ima određene pozitivne karakteristike kao što je osiguravanje stabilnosti pjene, izvor dušika za rast i metabolizam kvasca tijekom fermentacije, ali i negativne poput zamućenja piva (Mohaček 1948.; Kunze, 1994.).

Prema topljivosti proteini se dijele na: albumine, globuline, prolamine (oko 50 % u zrnu ječma) i gluteline.

UGLJIKOHIDRATI

Najveći dio suhe tvari zrna ječma čine ugljikohidrati. Značajnu ulogu imaju škrob, šećeri i celuloza te hemiceluloze i gumaste tvari. Škrob je najvažniji sastojak ječma i ima ga do 67 % u suhoj tvari. Nalazi se u stanicama endosperma u obliku škrobnih zrnaca te predstavlja rezervnu energiju za preživljavanje embrija. Škrobna zrnca se sastoje od amiloze koja je ravnančana molekula gdje su jedinice glukoze povezane α -(1,4) glikozidnim vezama i amilopektina koji je veći polimer razgranate strukture čije su jedinice glukoze povezane α -(1,4) i α -(1,6) glikozidnim vezama. Zbog različite strukture amiloze i amilopektina, različita je i njihova mogućnost razgradnje prilikom slađenja i ukomljavanja. Škrob koji ima visok udio amiloze i voštani škrob imaju veću temperaturu želatinizacije od standardnog škroba. Tijekom ukomljavanja škrob koji ima visok udio amiloze pokazuje veću otpornost na enzimsku razgradnju. Voštani škrob (udio amiloze manje od 15 %) ima niži sadržaj ekstrakta što je povezano sa nižim stupnjem modifikacije, te veću količinu β -glukana (Šimić, 2009.).

Nakon žetve zrno se nalazi u stanju mirovanja, te se u njemu nalazi samo mala količina šećera (1,8 – 2 %). Šećer koji je većinom zastupljen je saharoza. Zbog lakog transportiranja koriste se u metabolizmu embrija (Kunze, 1994.; Šimić, 2009.; Magdić, 2017.).

U zrnu ječma se nalazi oko 2 – 5 % celuloze i to isključivo u pljevici. Celuloza je netopljiva u vodi, te je enzimi koji nastaju tijekom klijanja ne razgrađuju tako da ne utječe na kakvoću piva. Osnovni sastojci staničnih stijenki endosperma su hemiceluloze, a sastoje se od β -glukana (80 – 90 %) i arabinoksilana (10 – 20 %). β -glukan je izgrađen od nerazgranatih lanaca ostataka glukoze povezanih β -(1,4) i β -(1,3) vezama. Molekule arabinoksilana sastoje se od pentoznih molekula, ksiloze i arabinoze. Za vrijeme procesa slađenja i ukomljavanja dolazi do djelomične razgradnje prethodno navedenih molekula, međutim njihov utjecaj na proizvodnju i kakvoću piva nema velik utjecaj (Šimić, 2009.; Magdić, 2017.).

LIPIDI

Lipidi se u zrnu ječma u najvećoj količini nalaze u aleuronskom sloju i klici. Njihova količina u zrnu ječma je 2 – 3 %. Uglavnom su to trigliceridi gdje je glicerol esterificiran višim masnim kiselinama: oleinska, stearinska, linolna i linolenska. Tijekom proizvodnje piva lipidi neiskorišteni prelaze u pivski trop, te s toga nemaju bitan utjecaj na kakvoću finalnog proizvoda.

MINERALI

U zrnu ječma minerala ima 2 – 3 % i većinom se nalaze u obliku anorganskih spojeva. Među najzastupljenijim su fosfati (35 %), silikati (25 %) i soli kalija (20 %).

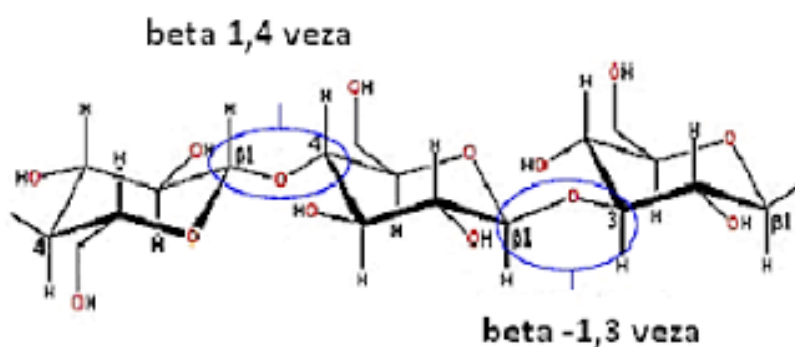
U malim količinama se u ječmu nalaze taninske i gorke tvari, enzimi i vitamini. Taninske tvari pripadaju skupini polifenola te se nalaze u pljevici ječma, ali i u aleuronskom sloju. Tanini pivu daju opor okus, a s debljiinom pljevice njihova količina raste.

Vitamini koji su najviše zastupljeni u zrnu ječma su vitamin B₁ (tiamin) i vitamin B₂ (riboflavin). Oni se većinom nalaze u vanjskim dijelovima zrna. U malim količinama se nalazi vitamin C (askorbinska kiselina), te vitamin E (tokoferol) koji se nalazi u klici.

U stadiju mirovanja se u zrnu ječma nalazi mali broj enzima koji se većinom nalaze u netopljivom, vezanom obliku. Tijekom procesa klijanja ječma dolazi do aktivacije ili sintetiziranja većeg dijela enzima. Oni su bitni za pretvorbu netopljivih sastojaka endosperma u topljivi oblik, koji tada mogu služiti embriju za dobivanje energije i izgradnju sastojaka stanice.

2.2. β -GLUKANI

Sastoje se od linearnih lanaca glukopiranoznih jedinica koje su povezane β -(1,3) i β -(1,4) vezama. Zbog neravnomjerno raspoređenih veza u molekuli u određenim uvjetima nastaju duži lanci sa β -(1,4) vezama ili po nekoliko β -(1,3) veza jedna iza druge. Zbog različitog rasporeda veza različita je i struktura molekula što utječe na mogućnost enzimske razgradnje. β -glukani lako prelaze u gel stanje što dovodi do porasta viskoznosti, te otežane filtracije. Ovo svojstvo ih svrstava u gumaste tvari.



Slika 3 Struktura (1,3),(1,4)- β -D glukana ječma (VitaminPROS, 2017.)

U prirodi se β -glukani nalaze u staničnim stijenkama mekinja žitarica (ječam, raž, zob i pšenica) te u nekim vrstama gljiva (Reishi, Shiitake i Maitake). Prisutni su i u algama, kvascima i bakterijama. Iako su škrob i β -glukani izgrađeni od molekula glukoze oni se međusobno razlikuju zbog različitih veza među građevnim jedinicama. β -glukani se ponašaju kao prehrambena vlakna i nisu probavljivi, za razliku od škroba. Ne spadaju u esencijalne nutrijente, ali je dokazano da imaju određeni pozitivni učinak na ljudsko zdravlje. Neki od tih utjecaja su da poboljšavaju imunitet, smanjuju krvni pritisak, smanjuju razinu kolesterola. β -glukani oblikuju viskoznu otopinu u probavnom sustavu, te usporavaju apsorpciju glukoze nakon jela što pomaže održavanju dobrog odnosa glukoze i inzulina u krvi.

2.2.1. β -glukani u pivarstvu

U staničnim stijenkama škrobnog endosperma nalaze se uglavnom β -glukani (70 – 75 %), arabinoksilani (15 – 20 %), manje količine bjelančevina (5 %) i glukomanani (3 %). β -glukani žitarica pripadaju skupini homopolisaharida (izgrađeni od glukoze) te sadrže oko 70 % β -(1,4) glikozidnih veza i 30 % β -(1,3) veza. β -(1,3) glikozidne veze sprječavaju gusto pakiranje lanca i na taj način čine β -glukane djelomično topljivim (Jadhav i sur., 1998.; Jiang i Vasanthan, 2000.). Udio β -glukana u ječmu može iznositi 2 – 11 % izraženo na suhu tvar, čija količina uveliko ovisi o genetskom podrijetlu i okolišnim uvjetima (Lehtonen i sur. 1987a; Šimić, 2009.).

Tijekom klijanja, djelovanjem glukanolitičkih enzima, netopljivi β -glukani postaju topljivi. Oni tvore viskozne otopine u vodi i na taj način postaju tehničke poteškoće koje se javljaju za vrijeme proizvodnje piva. Uzrokuju probleme kod ekstrakcije, filtracije i nastajanja zamućenja piva (Enari i sur., 1986.; Šimić, 2009.). Enzimska hidroliza β -glukana značajna je kod optimiranja tehničkog postupka slađenja zrna.

Visok sadržaj β -glukana može dovesti do nedovoljne razgrađenosti staničnih zidova, a posljedično tome ima slabiju difuziju enzima koji nastaju klijanjem. Rezultat je niža razina ekstrakta kod slada. Zbog ostataka nerazgrađenih glukana dolazi do povećanja viskoznosti sladovine, a to dovodi do otežane filtracije, što može dovesti do hladnog zamućenja (Wang i sur., 2004.).

Neka istraživanja su dokazala da je visoka razina β -glukana pronađena kod golozrnih sorti ječma i sorti ječma s voštanim škrobom (Zhang i sur., 2002.). Razlike u njihovoj količini u zrnu su pripisane i analitičkim metodama koje su se primjenjivale. Više vrijednosti su dobivene kada

se koristila metoda mjerenja viskoznosti. McCleary i Glennie-Homes su 1985. razvili enzimsku metodu koja ima jednostavnu proceduru te dobru ponovljivost (Magdić, 2017.).

Sadržaj β -glukana u sladovini ne ovisi samo od njegovog sadržaja u zrnu nego i o aktivnosti β -glukanaze za vrijeme slađenja. Bitno je pratiti potencijal nastanka navedenog enzima tijekom klijanja. Razgradnju β -glukana provode dva enzima iz slada koji imaju različit temperaturni optimum i proizvode hidrolize (Marić, 2009.).

β -glukan + β -glukanaza (45 – 50 °C) \rightarrow β -glukanski dekstrin

β -glukan + β -glukan-solubilaza (60 – 65 °C) \rightarrow otopljeni β -glukan

U ječmu je prisutna endo- β -glukanaza, a tijekom slađenja se sintetizira egzo- β -glukanaza. β -glukan-solubilaza oslobađa β -glukan iz kompleksa sa proteinima, te se njena aktivnost za vrijeme procesa slađenja povećava i do 170 % (Kunze, 1994.; Magdić, 2017.).

2.3. SLAD

2.3.1. Odabir ječma za slađenje

Ječam koji se koristi za proizvodnju slada mora zadovoljiti zahtjeve koje je postavila industrija slada i piva, kako bi se dobio kvalitetan finalni proizvod. Pivski ječam se većinom odabire na temelju sorte i područja njegove proizvodnje. Pri odabiru ječma za slađenje potrebno je odrediti ulaznu kakvoću ječma, a ona se određuje mehaničkim, fiziološkim, kemijskim i biokemijskim ispitivanjima. Prvi od zahtjeva je da sadrži nizak udio bjelančevina (max 11,5 %), te zadovoljavajući urod (Šimić, 2009.).

2.3.2. Proizvodnja slada

Osnovna sirovina za proizvodnju slada je ječam. Prije samog procesa proizvodnje slada potrebno je izvršiti faze čišćenja, sortiranja i pravilnog skladištenja ječma. Primjenjujući ove postupke sprječava se narušavanje kakvoće slada. Skladištenje ječma je potrebno do nestanka dormantnosti. Sortiranje je bitno jer zrna različitih dimenzija različito primaju vlagu (Šimić, 2009.; Štefanić i Marić, 1990.).

Tablica 2 Procesni parametri u različitim fazama slađenja (Schuster i sur. 1988.)

Ječam	Skladištenje	Vlaga	12 – 14 %
		Temperatura	12 °C
Modifikacija endosperma	Močenje	Udjel vode	45 %
	Klijanje	Vrijeme	5 dana
		Temperatura	12 – 16 °C
	Sušenje	Temperatura	Oko 85 °C
		Vlažnost	4 %
Slad	Dorada slada i skladištenje		

Prema tradiciji proizvodnje piva, ječam se prevede u slad, a od slada se proizvodi pivo. Ječam se može koristiti u proizvodnji kao zamjena za dio slada. Zbog velike količine škroba u zrnu i pljevice koja zaostaje na zrnu nakon žetve, ali i nakon pretvorbe u slad, ječam je odlična sirovina za proizvodnju piva. Pljevica u kasnijim fazama proizvodnje čini filtracijski sloj za cijedenje sladovine (Šimić, 2009.; Kunze, 1999.; Gaćeša, 1979.).

Postupak slađenja u industriji piva dijeli se na pet faza: čišćenje i sortiranje ječma, močenje sortiranog ječmenog zrna, klijanje namočenog zrna, sušenje zelenog slada, dorada zelenog slada (Marić, 2000.).

Močenjem zrno upija vodu, bubri i povećava svoj volumen za trećinu. Udio vode se s početnih 10 – 14 % povećava na 42 – 45 %. Močenje se smatra završenim kada primarni korjenčić probije pljevicu zrna i pojavljuje se kao zamjetna bijela točka (Marić, 2000.). Na početku samog procesa vlaga prodire u dijelu gdje je embrij, a zatim u bočne omotače. Bitni parametri o kojim ovisi upijanje vode su temperatura, dimenzija zrna, sorta, godina žetve, te trajanje močenja. Zbog primanja vlage dolazi do intenzivnog disanja zrna, te je potrebno osigurati dovoljnu količinu kisika. Ako se ne izvrši prozračivanje dolazi do intramolekulskog disanja što na kraju uzrokuje odumiranje zrna (Kunze, 1994.).

Klijanjem se namočeno zrno prevodi u zeleni slad čija je karakteristika razgrađenost endosperma zrna i visok udio aktivnih enzima (Štefanić i Marić, 1990.). Za vrijeme klijanja raste i razvija se korjenčić i klica. Korjenčići se uklanjaju jer predstavljaju gubitak, te se njihov rast treba ograničiti. Iz tog razloga se klijanje provodi na što nižoj temperaturi i što kraće vrijeme (Kunze, 1994.).

Zbog očuvanja svojstava slada kao to su karakteristični okus, aroma i boja provodi se sušenje i dorada zelenog slada. Potrebno je očuvati enzimsku aktivnost slada (Marić, 2000.).

Slađenjem ćemo dobiti sirovinu koja će uz proces ukomljavanja biti iskoristiva za mikroorganizme.

2.3.3. Svojstva i tipovi slada

Osnovne karakteristike dobrog pivarskog slada čine:

- ujednačena svijetlo-žuta boja
- čist, svjež miris karakterističan za tip slada
- cijela zrna bez prisutnog zrna stranog podrijetla, prašine, klice (Štefanić i Marić, 1990.).

Neki od fizikalnih i kemijskih pokazatelja kakvoće svijetlog slada su dani u **Tablici 2**. Fizikalno-kemijske analize i ukomljavanje kongresnom metodom se provode nakon mljevenja slada. Određivanje β -glukana se provodi prije mljevenja, dok se topljivi β -glukani određuju u sladovini nakon procesa ukomljavanja.

Tablica 3 Pokazatelji kakvoće svijetlog tipa slada (Marić, 2000.)

Fizikalna svojstva	Masa 1000 zrna	25 – 35 g s.t. slada
	Friabilnost	>80 %
Fizikalno-kemijska svojstva	Viskoznost	<1,5 mPas
	Ekstrakt	>80 %
	Razlika ekstrakta	<1,8 %
	β -glukani	2,58 – 4,87 g/100 g s.t.

Razlikujemo nekoliko specijalnih vrsta slada uz svijetli (plzenski) tip slada, a to su: dijastatski slad (uz primjenu neslađenih sirovina), melanoidinski slad (posebne vrste piva), karamelni slad (aromatizacija), slad za bojanje, slad drugih žitarica (Štefanić i Marić, 1990.).

3. EKSPERIMENTALNI DIO

3.1. ZADATAK

Ustanoviti promjene u koncentraciji β -glukana tijekom slađenja (veličinu smanjenja polazne koncentracije β -glukana u suhoj tvari zrna prije i poslije slađenja), te udjel topljivog u ukupnim β -glukanima u sladu (mjereno kao razlika između koncentracije β -glukana u polaznom, sladu i dobivenoj sladovini). Nadalje, utvrditi će se koje sorte iz ispitivanog sortimenta (25 sorti) daju sladovine sa preporučenom koncentracijom β -glukana (220 mg/L).

3.2. MATERIJAL I METODE

Za potrebe istraživanja ispitano je dvadeset i pet uzoraka ječma koji su uzeti iz sortnih pokusa Poljoprivrednog instituta Osijek. Prema namjeni uzorci se mogu svrstati u stočne, pivarske i višenamjenske sorte. Veći broj uzoraka pripada stočnim sortama što se može vidjeti u **Tablici 4.**

Uzorci se također razlikuju prema tipu sezonskog rasta i prema položaju zrna oko centralnog vretena klasa. Najviše uzoraka pripada ozimim, dvorednim sortama. Također je ispitan i manji broj višerednih ozimih i dvorednih jarih sorti. Golozrnom tipu ječma pripadaju dva uzorka (Osk. 5.119/10-12, Osvit). Četiri sorte su kontrolni uzorci (Vanessa, Tiffany, Sandra, Casanova).

Uzorci od svake sorte su se prikupili s lokacije u Osijeku, a nakon toga spremili kao dorađeno i netretirano zrno. Čuvali su se do analize na suhom i hladnom kako bi se prevladala posliježetvena „pospanost“ zrna.

Tablica 4 Uzorci ječma za slađenje i analizu slada

1	Bravo	Stočni	Ozimi dvoredni
2	Bingo	Stočni	Ozimi dvoredni
3	Maxim	Stočni	Ozimi dvoredni
4	Rex	Stočni	Ozimi dvoredni
5	Tuna	Stočni	Ozimi dvoredni
6	Barun	Višenamjenski	Ozimi dvoredni
7	Lukas	Višenamjenski	Ozimi dvoredni
8	Gazda	Višenamjenski	Ozimi dvoredni
9	Maestro	Višenamjenski	Ozimi dvoredni
10	Osk. 6.61-4-13	Višenamjenski	Ozimi dvoredni
11	Casanova (kontrola)	Višenamjenski	Ozimi dvoredni
12	Sandra (kontrola)	Višenamjenski	Ozimi dvoredni
13	Vanessa (kontrola)	Pivarski	Ozimi dvoredni
14	Tiffany (kontrola)	Pivarski	Ozimi dvoredni
15	Titan	Stočni	Ozimi šestoredni
16	Lord	Stočni	Ozimi šestoredni
17	Oliver	Stočni	Ozimi šestoredni
18	Stribor	Stočni	Jari dvoredni
19	Matej	Stočni	Jari dvoredni
20	Jaran	Stočni	Jari dvoredni
21	Ikar	Višenamjenski	Jari dvoredni
22	Dado	Višenamjenski	Jari dvoredni
23	Pivarac	Pivarski	Jari dvoredni
24	Osvit	Stočni	Ozimi dvoredni-golozrni
25	Osk. 5.119-10-12	Stočni	Ozimi dvoredni-golozrni

3.2.1. Mikroslađenje

Mikroslađenje uzoraka ječma je provedeno na Poljoprivrednom institutu u Osijeku prema MEBAK (2011.) analitici. U **Tablici 5** su prikazani procesni parametri prema kojima je se odvijao postupak slađenja. Proces je trajao sedam dana, a korišteno je po 250 g svakog uzorka.

Tablica 5 Procesni parametri mikroslađenja

MOČENJE			
Faze močenja	Protok zraka (%)	Temperatura (°C)	Vrijeme (h)
Prva faza pod vodom	-	16	6
Prva faza zračnog odmaranja	100	17	12
Druga faza pod vodom	-	17	6
Druga faza zračnog odmaranja	100	18	12
Treća faza pod vodom	-	17	2
Treća faza zračnog odmaranja	-	-	-
KLIJANJE			
Prva faza klijanja	75	17	96
Vrijeme između okretanja	-	-	2
Broj rotacija po okretanju	3		
SUŠENJE			
Prva faza sušenja	100	60	6
Druga faza sušenja	100	65	3
Treća faza sušenja	90	68	2
Četvrta faza sušenja	90	70	2
Peta faza sušenja	50	80	2
Šesta faza sušenja	50	83	2
Sedma faza sušenja	40	85	1



Slika 4 Priprema ječma za mikroslađenje

3.2.2. Kongresna metoda ukomljavanja

Kongresna metoda ukomljavanja je rađena prema MEBAK (2011.) analitici. Uključuje mljevenje slada na dva načina u posebnim mlinovima. Prvim postupkom se dobiva fino usitnjen uzorak koji sadrži 90 % brašna, dok se drugim postupkom dobiva grubo samljeven uzorak sa sadržajem od 25 % brašna. Za potrebu analize uzima se 50 g od samljevenog uzorka, fine i grube meljave. Uzorci se ukomljavaju u posebnim posudama s 200 mL destilirane vode. Ukomljavanje se odvija na različitim temperaturama gdje je prva temperatura 45 °C i održava se 30 min. U narednih 25 min temperatura se postepeno povećava na 70 °C, a zatim se dodaje 100 mL destilirane vode (također zagrijane na 70 °C) i ta se temperatura održava narednih 1 h. Nakon hlađenja na sobnu temperaturu, posude se nadopune destiliranom vodom tako da ukupan dodatak destilirane vode bude 400 mL. Slijedi postupak filtriranja dobivene sladovine, te određivanja parametara. Za potrebe ovog istraživanja određena je viskoznost sladovine.



Slika 5 Uređaj na kojem se provodi kongresna metoda ukomljavanja slada



Slika 6 Filtracija dobivene sladovine

3.2.3. Određivanje viskoznosti

Viskoznost kongresne sladovine je ključan tehnološki pokazatelj razgradnje hemiceluloza. Uređaj pomoću kojeg se određuje viskoznost je automatizirani mikroviskozimetar. Sastoji se od kapilare i padajuće kuglice, a za mjerenje se koristi vrlo mala količina uzorka. Uređaj radi

po Hoppler-ovom principu padajuće kuglice, a izmjerene vrijednosti preračunate su na 8,6 % ekstrakta kongresne sladovine i izražene u mPas (Analitika EBC-a, metoda 4.8).



Slika 7 Uzimanje uzorka za mjerenje viskoznosti kongresne sladovine

3.2.4. Određivanje β -glukana

Za potrebe ovoga rada određeni su β -glukani u ječmu, sladu i sladovini. Korištene su standarde EBC metode.

Određivanje sadržaja β -glukana Megazyme kitom u ječmu, modificirana metoda (EBC Metoda 3.11.1)

1. Sameljati uzorak ječma kroz 0,5 mm sito.
2. Precizno odvagati oko 0,15 g uzorka u plastičnu tubicu od 15 mL (zapisati točnu odvagu na 4 decimale). Odrediti sadržaj vode u uzorku (na Halogenom analizatoru).
3. Dodati 500 μ L 50 % EtOH (v/v) u tubicu kako bi se izbjegla naknada disperzija uzorka.
4. Dodati 2,5 mL NaH_2PO_4 pufera (20 mM, pH 6,5) i promiješati sadržaj na vortexu.

5. Inkubirati tubu u kipućoj vodi oko 2 min. Izvaditi tube iz kipuće kupelji i promiješati sadržaj na vortexu. Ponovno zagrijati sadržaj tube u kipućoj kupelji narednih 3 min (stalno voreksirati kako bi se spriječilo geliranje sadržaja). Nakon kuhanja smjesa bude dosta viskozna pa se dodaje 3 mL destilirane vode i promiješa na vortexu.
6. Dodati 100 μ L lichenase (10 U) u tubu. Začepiti tubu, promiješati na vortexu i inkubirati 1 h na 40 °C.
7. Prilagoditi volumen tube na 14 mL dodavanjem još 8 mL destilirane vode.
8. Temeljito promiješati sadržaj tube i centrifugirati alikvot na 1500 g tijekom 10 min.
9. Precizno i točno otpipetirati alikvot od 50 μ L uzorka na dno 3 čiste tube.
10. U jednu od tuba precizno i točno na uzorak dodati 50 μ L Na-Ac pufera (50 mM, pH 4).
To je slijepa proba reakcije.
11. U druge dvije dodati 50 μ L beta-glukozidaze (0,2 U). Inkubirati tube na 40 °C tijekom 15 min. Tube mogu ostati odčepljene. Bitno je da se uzorak i β -glukozida izmješaju pa treba biti jako precizan pri pipetiranju.
12. Istovremeno uz uzorke, pripremiti i slijepu probu reagensa te standard (D-glukoza; 1 mg/mL). Slijepu probu reagensa (koja se koristi za nuliranje spektrofotometra tijekom svih mjerenja) pripremiti miješanjem:
50 μ L dH₂O + 50 μ L Na-Ac pufera (50 mM, pH 4) + 1,5 mL GOPOD (glukoza oksidaza-peroksidaza) reagensa
Standard D-glukoze pripremiti miješanjem:
50 μ L D-glukoze (1mg/mL) + 50 μ L Na-Ac pufera (50 mM, pH 4) + 1,5 mL GOPOD reagensa
13. I slijepu probu reagensa i standard inkubirati s uzorcima na 40 °C tijekom 20 min.
14. Dodati 1,5 mL GOPOD reagensa u svaku tubu i inkubirati na 40 °C tijekom 20 min.
15. Izmjeriti absorbancu uzorka na 510 nm.

Određivanje sadržaja β -glukana Megazyme kitom u sladu (EBC Metoda 4.16.1)

1. Samljeti uzorak slada kroz 0,5 mm sito.
2. U 0,3 g slada dodati 2,5 mL 50 % EtOH (v/v).
3. Inkubirati u kipućoj vodenoj kupelji 5 min. Promiješati na vortexu i dodati još 2,5 mL 50 % EtOH (v/v), te promiješati.
4. Centrifugirati 10 min na 1000 g. Dekantirati i baciti supernatant.

5. Otopiti peletu u 5 mL 50 % EtOH (v/v), centrifugirati, ponovno oddekantirati i baciti supernatant.
6. Otopiti peletu u 2,5 mL NaH₂PO₄ (20 mM, pH 6,5).
7. Dalje analizirati prema protokolu za ječam krenuvši od 5. koraka.

Izračun za ječam i slad (prilagođen prema modifikacijama metode):

$$\beta\text{-glukan (\% w/w)} = \Delta A \times F \times 280 \times \frac{1}{1000} \times \frac{100}{W} \times \frac{162}{180} = \Delta A \times \frac{F}{W} \times 25,2 \quad (1)$$

ΔA = absorbanca uzorka umanjena za absorbancu slijepe probe reakcije

F = faktor pretvorbe absorbance u μg D-glukoze

$F = 50 (\mu\text{g D-glukoze}) / \text{absorbanca } 50 \mu\text{g D-glukoze} \approx 50 / 1.1 \approx 45.45$

280 = faktor prilagodbe volumena (0.05 mL je uzeto u reakciju iz volumena 14 mL)

W = izračunata masa u miligramima izražena prema suhoj tvari

Određivanje sadržaja β -glukana Megazyime kitom u sladovini (EBC Metoda 8.11.1)

1. Označiti i izvagati prazne plastične tube od 15 mL (bez čepa) i zapisati mase.
2. Svaku tubu tarirati na nulu i u svaku odvagati 1,25 g (NH₄)₂SO₄ (usitnjenog u tarioniku) s točnošću $\pm 0,01$ te zapisati mase.
3. U tubu s odvaganim (NH₄)₂SO₄ dodati 2,5 mL sladovine, izvagati ukupan volumen, zatim tubu začepiti i izmiješati sadržaj laganim izvrtanjem dok se amonijev sulfat ne otopi (ne na vorteksu kako bi se izbjeglo pjenjenje).
Iz zapisanih odvaga izračunati masu sladovine u 2,5 mL na način da se od mase ukupnog sadržaja tube (oko 8 g) oduzme masa prazne tube + masa amonijevog sulfata. Dobivena vrijednost je masa 2,5 mL sladovine. Izračunati masu 2,4 mL sladovine $((2,4 \text{ mL} \times \text{masa } 2,5 \text{ mL sladovine}) / 2,5 \text{ mL})$;
Izračun mase 2,4 mL sladovine je potreban u koraku 11.
4. Tubu s tako pripremljenim uzorkom ostaviti da stoji 20 sati na 4 °C.
5. Nakon 20 h, sadržaj tube odvojiti centrifugiranjem na 2 000 g tijekom 10 min.
6. Odliti supernatant i baciti ga.

7. Talog otopiti sa 0,5 mL 50 % EtOH dodajući ga u uzorak tijekom vorteksiranja, a zatim dodati još 5 mL 50 % EtOH i dobro promiješati sadržaj iskretanjem tube.
8. Sadržaj tube odvojiti centrifugiranjem na 2 000 g tijekom 10 min. Odliti i baciti supernatant.
9. Ponoviti još jednom proceduru ispiranja EtOH kao u koracima 7. i 8.
10. Odliti i baciti supernatant.
11. Talog otopiti sa NaH_2PO_4 (20 mM; pH 6,5) na način da se pipetom na vagi dodaje pufer do mase izračunate u koraku 3. Na taj način je volumen namješten na 2,4 mL.
12. Zatim dodati 0,1 mL enzima lichenase i inkubirati sve na 40°C tijekom 5 min. Centrifugirati na 2000 g tijekom 10 min i potom uzorak nastaviti tretirati kao u koraku 9. metode za ječam.

Izračun za sladovinu (prilagođen prema modifikacijama metode):

$$\beta - \text{glukan} \left(\frac{\text{mg}}{\text{L}} \right) = \Delta A \times F \times 5\,000 \times \frac{1}{1000} \times \frac{5}{5} \times \frac{162}{180} = \Delta A \times F \times 4,5 \quad (2)$$

ΔA = absorbanca uzorka umanjena za absorbancu slijepe probe reakcije

F = faktor pretvorbe absorbance u μg D-glukoze

$F = 50 \text{ } (\mu\text{g D-glukoze}) / \text{absorbanca } 50 \text{ } \mu\text{g D-glukoze} \approx 50 / 1.1 \approx 45.45$

5 000 = faktor za prilagodbu volumena (0,05 mL uzorka je analizirano, a rezultat je izražen po litri)

4. REZULTATI I RASPRAVA

4.1. REZULTATI

Tablica 6 Rezultati analiza, uzorci od 1 do 11

Br.	Sorta	β -glukani					Viskoznost
		(g/100 g s.t.)			(%)	(mg/L)	(mPas)
		Ječam	Slad	Δm	Δm^*	Sladovina	Sladovina
1	Barun	3,52	1,63	1,89	46,30	205,34	2,257
2	Bravo	4,22	1,69	2,35	40,00	268,40	2,290
3	Bingo	4,07	2,72	1,35	55,80	303,23	1,713
4	Maxim	4,05	2,54	1,51	62,70	288,86	2,370
5	Rex	5,49	2,90	2,59	52,80	323,18	2,338
6	Lukas	4,13	1,87	2,26	45,30	317,33	2,158
7	Gazda	3,86	2,61	1,25	32,40	334,95	2,081
8	Tuna	4,14	2,16	1,98	52,00	295,09	1,870
9	Maestro	4,17	1,53	2,64	36,70	247,23	1,984
10	Osk. 6.61-4-13	3,18	1,91	1,27	40,00	210,01	1,784
11	Vanessa	3,63	1,02	2,61	28,00	110,71	1,519

Tablica 7 Rezultati analiza, uzorci od 12 do 25

Br.	Sorta	β -glukani					Viskoznost
		(g/100 g s.t.)			(%)	(mg/L)	(mPas)
		Ječam	Slad	Δm	Δm^*	Sladovina	Sladovina
12	Tiffany	3,55	0,83	2,72	23,40	100,15	1,516
13	Casanova	3,92	1,05	2,87	26,80	153,39	1,654
14	Sandra	4,55	1,85	2,70	40,60	237,59	1,976
15	Titan	4,09	1,96	2,13	47,90	287,60	2,108
16	Lord	4,07	2,05	2,02	50,47	268,85	1,987
17	Oliver	4,22	1,87	2,35	44,30	264,72	1,912
18	Matej	4,06	1,27	2,79	31,3	235,27	1,818
19	Ikar	4,50	1,35	3,15	30,00	149,65	1,714
20	Stribor	4,18	0,83	3,35	19,8	179,46	1,842
21	Jaran	4,15	1,40	2,75	33,7	192,41	1,687
22	Dado	5,11	1,22	3,89	23,9	155,22	1,699
23	Pivarac	4,80	0,83	3,97	17,3	80,7	1,557
24	Osvit	4,83	2,78	2,12	57,55	312,86	3,220
25	Osk. 5.119-10-12	4,51	2,93	1,58	64,5	280,47	2,670

$\Delta m = \Delta m \beta\text{-glukan (ječam – slad)}$

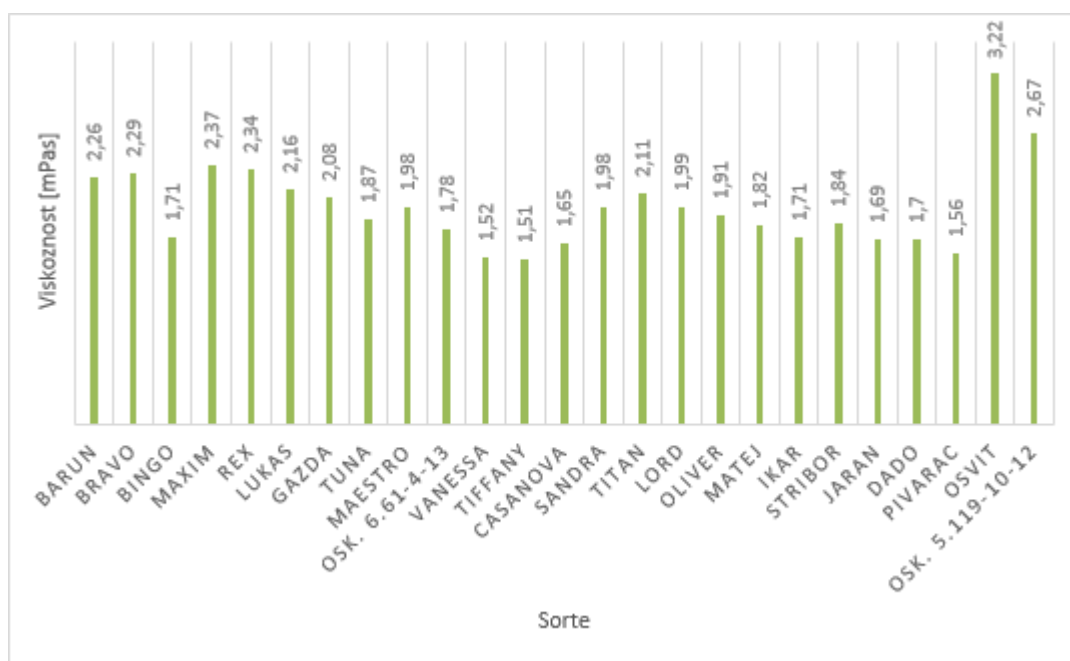
$\Delta m^* = \% \text{ nerargrađenog } \beta\text{-glukana zaostalog u sladu u odnosu na polazni } \beta\text{-glukan u ječmu}$

Tablica 8 Prosječni udjeli i prosječna razlika mase β -glukana u ječmu, sladu i sladovini po namjenskim sortnim grupama

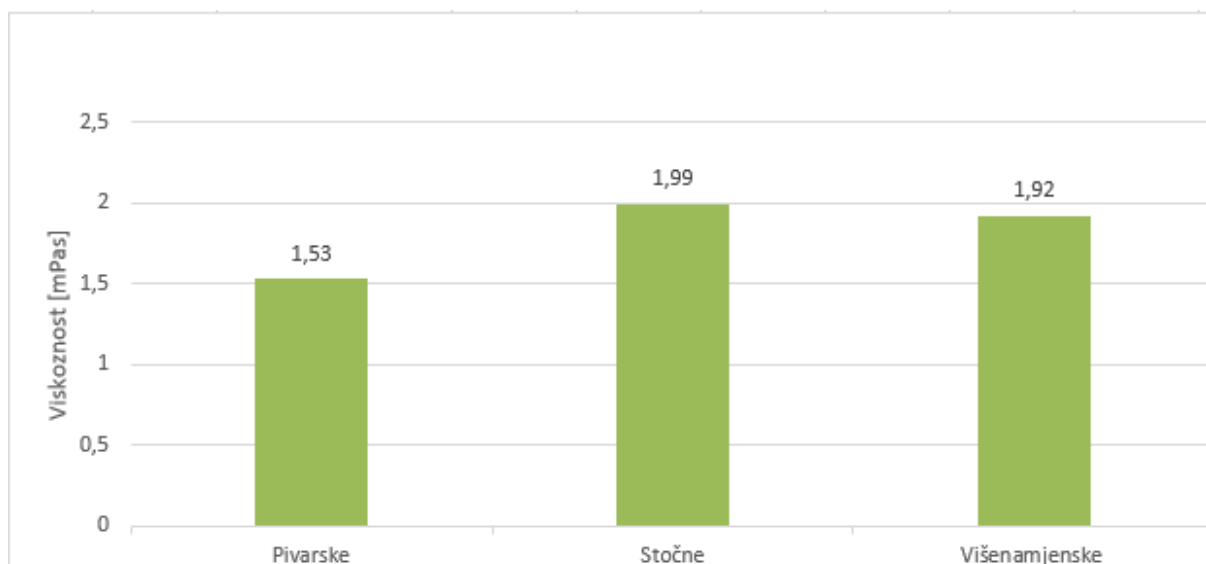
Br.	Namjenske sortne grupe		β -glukan				
			(g/100 g s.t.)			(%)	(mg/L)
			Ječam	Slad	Δm	Δm^*	Sladovina
1	Ozime dvoredne	Stočne	4.39	2.4	1.96	52.7	295.75
2	Ozime dvoredne	Višenamjenske	3.77	1.91	1.86	51.2	26.97
3	Ozime dvoredne	Stočne + višenamjenske	4.08	2.16	1.88	51.4	279.36
4	Ozime dvoredne	Višenamjenske (kontrolna)	4.24	1.45	2.79	33.7	195.49
5	Ozime dvoredne	Pivarske (kontrolna)	3.59	0.93	2.67	25.7	105.43
6	Ozime dvoredne	Višenamjenske (kontrolna) + pivarske (kontrolna)	3.91	1.19	2.73	29.7	150.46
7	Ozime šestoredne	Stočne	4.13	1.96	2.17	47.5	273.72
8	Jare dvoredne	Stočne	4.13	1.17	2.96	28.3	202.38
9	Jare dvoredne	Višenamjenske	4.81	1.29	3.52	27	152.22
10	Jare dvoredne	Pivarske	4.8	0.83	3.97	17.3	80.7
11	Jare dvoredne	Pivarske + višenamjenske + stočne	4.47	1.15	3.48	24.18	165.45
12	Golozrne		4.67	2.86	1.85	61	296.67

4.2. OBRADA REZULTATA

Viskoznost kongresne sladovine je pokazatelj citolitičke razgranje ječma, a često je ona indikator sadržaja β -glukana. Vrijednosti viskoznosti analiziranih uzoraka (**Slika 8**) kreću se u rasponu od 1,516 do 3,220 mPas. Najmanju vrijednost viskoznosti pokazuju kontrolni ozimi uzorci Tiffany i Vanessa te pripadaju kategoriji s vrlo dobrom razgrađenosti (<1,530 mPas). Ozimi dvoredni (golozrni) uzorak Osvit pokazuje najveću vrijednost viskoznosti od 3,22 mPas. Kada se promatraju vrijednosti viskoznosti sladovine kod različitih sortnih skupina (**Slika 9**), stočne sorte imaju najveću prosječnu vrijednost viskoznosti. Pivarske sorte imaju najmanju prosječnu vrijednost viskoznosti koja iznosi 1,531 mPas, dok su višenamjenske sorte između s prosječnom vrijednošću viskoznosti od 1,923 mPas.



Slika 8 Viskoznost sladovine kod pojedinih uzoraka



Slika 9 Visoznost sladovine kod različitih sortnih skupina

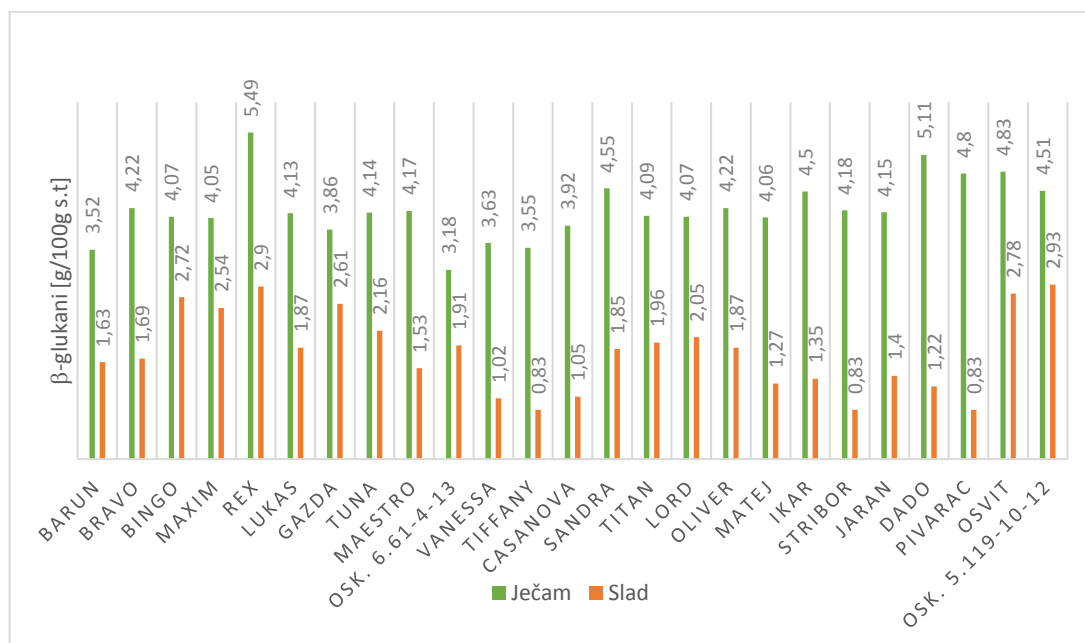
β -glukani su jako važni sastojci koji se nalaze u stijenkama stanica endosperma te utječu na karakteristike slada, ali i finalnog proizvoda piva. Najveće probleme uzrokuje makromolekularni gel koji stvaraju β -glukani, a ne mora biti u korelaciji sa ukupnim sadržajem β -glukana (Kunze, 1994.). U ovome radu su određeni β -glukani u ječmu, sladu i u kongresnoj sladovini.

Naime, za probleme u proizvodnji piva su odgovorni β -glukani koji su iz ječmenog zrna prešli u sladovinu. Zajedno s pentozanima, β -glukani su produkt raspadanja hemicelulozne stanice djelovanjem β -glukanaze tijekom modifikacije zrna ječma za vrijeme slađenja, te se otapaju ili suspendiraju u sladovini za vrijeme ukomljavanja (Vis i Lorenz, 1997.).

Udio β -glukana u uzorcima ječma i slada prikazan je na **Slika 10**. U uzorcima ječma udio β -glukana je u rasponu od 3,18 (Osk. 6.61/4-13) do 5,49 (Rex) g/100 g s.t.. Dvije jare sorte (Dado, Pivarac), golozrne sorte (Osvit, Osk. 5.119/10-12) i jedna kontrolna sorta (Sandra) pokazali su više vrijednosti u odnosu na ostale. Prema Krstanović i sur. (2016.) njemačke sorte (Tiffany i Vanessa) su ostvarile niže vrijednosti β -glukana u ječmu u odnosu na ostale ispitivane sorte (nije analizirana sorta Osk. 6.61/4-13). U usporedbi s rezultatima ovoga rada dolazi do podudaranja navedene tvrdnje.

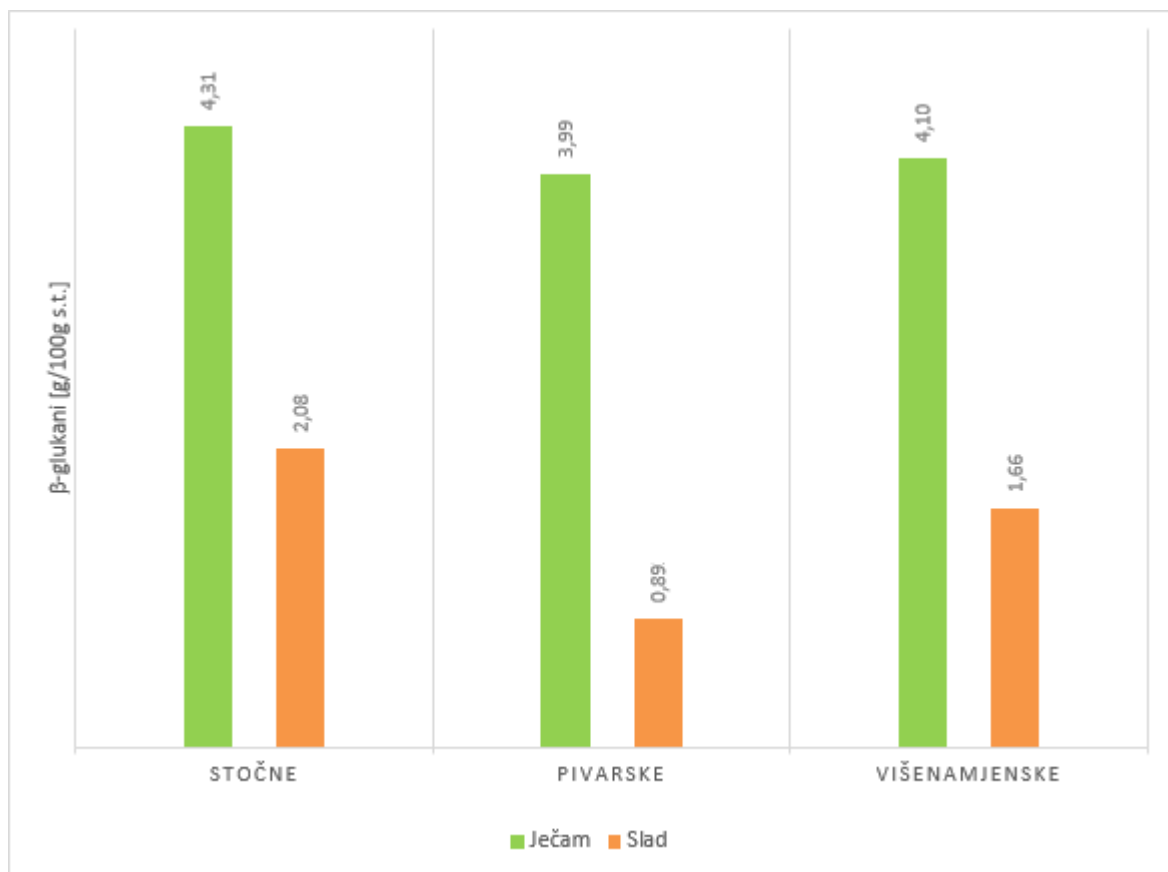
Nakon slađenja, dolazi do promjene sadržaja β -glukana. Najmanji udio se nalazi u sortama Stribor, Pivarac i Tiffany (0,83 g/100 g s.t.), a najveća vrijednost je ostvarena kod golozrne sorte Osk. 5.119/10-12 (2,93 g/100g s.t.). Najveće razlike u usporedbi sadržaja β -glukana u ječmu i sladu su uočene kod tri jare sorte: Dado, Ikar i Pivarac (klasificirana kao pivarska sorta).

Iz razlike sadržaja β -glukana moglo bi se pretpostaviti da su tri prethodno navedene jare sorte ostvarile najveću aktivnost enzima β -glukanaze. Ovu tvrdnju možemo usporediti sa istraživanjem Šimić i sur. (2015.) gdje je jedna sorta postigla najvišu vrijednost β -glukana u ječmu, a najnižu u sladu, te je ostvarila najveću aktivnost enzima β -glukanaze.



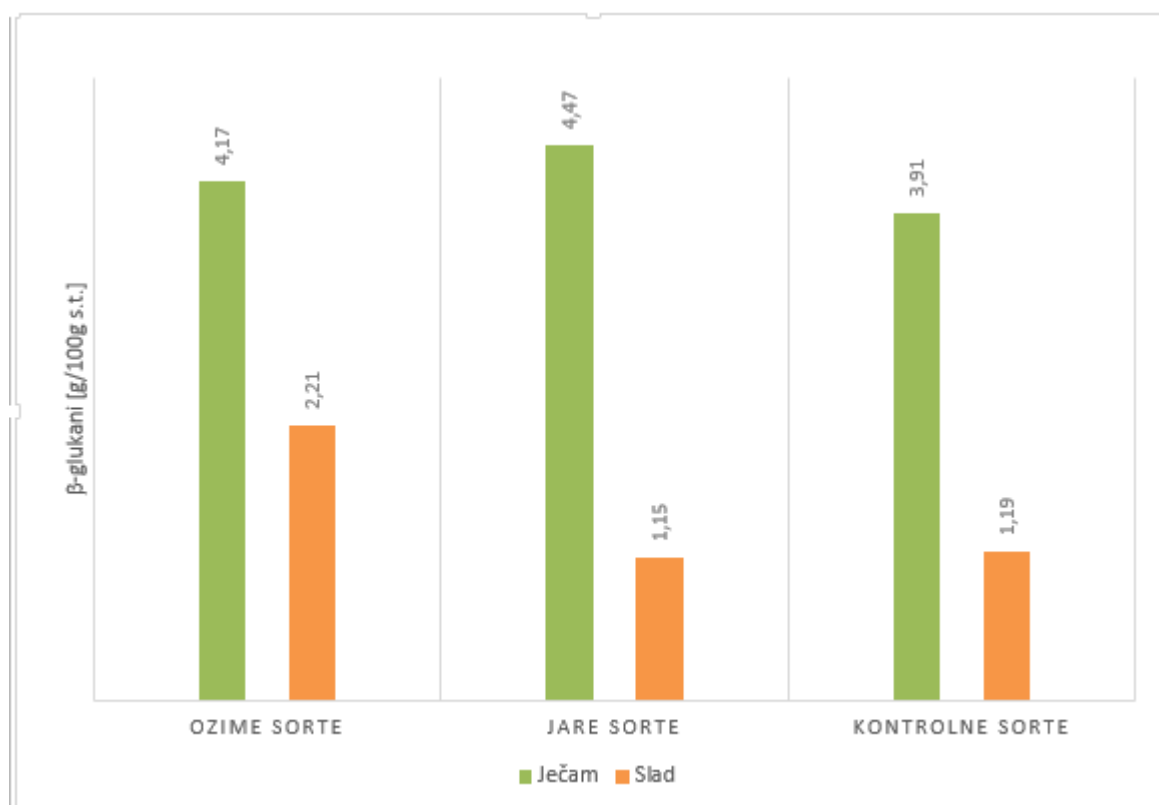
Slika 10 Udio β -glukana u uzorcima ječma i slada

U odnosu na stočne i višenamjenske sorte ječma, pivarske sorte pokazuju bolje rezultate kod slada i ječma (**Slika 11**), iako su kod ječma manje izražene razlike. Srednja vrijednost udjela β -glukana kod pivarskih sorti slada iznosi 0,89 g/100 g s.t..



Slika 11 Prosječni udio β -glukana u stočnim, pivarskim i višenamjenskim sortama ječma i slada

Najviši sadržaj β -glukana je kod jarih sorti ječma i u prosjeku iznosi 4,47 g/100 g s.t., dok je najniži sadržaj zabilježen kod kontrolnih ozimih sorti i iznosi 3,91 g/100 g s.t.. Nakon postupka slađenja prosječni sadržaj β -glukana jarih sorti je 1,15 g/100 g s.t., kod kontrolnih uzoraka je 1,19 g/100 g s.t., a kod ozimih sorti 2,21 g/100 g s.t. (**Slika 12**).



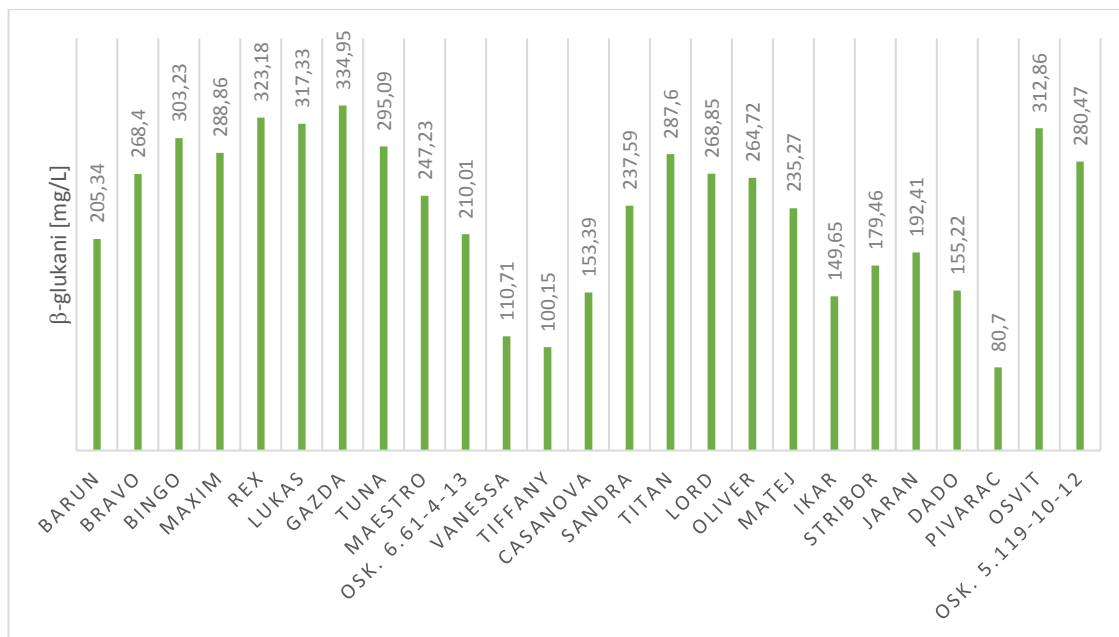
Slika 12 Prosječni udio β -glukana u uzorcima ječma i slada s obzirom na vrijeme sjetve

Yamashita i sur. (1985.) ističu kako nastali talog kada je pivo smrznuto se sastoji uglavnom od β -glukana. Ti β -glukani su bili u otopini, formirali talog kada je pivo bilo smrznuto i često se potpuno ne otope kada se pivo zagrije. Zbog ovakvih i sličnih problema potrebno je odrediti količinu β -glukana u sladovini.

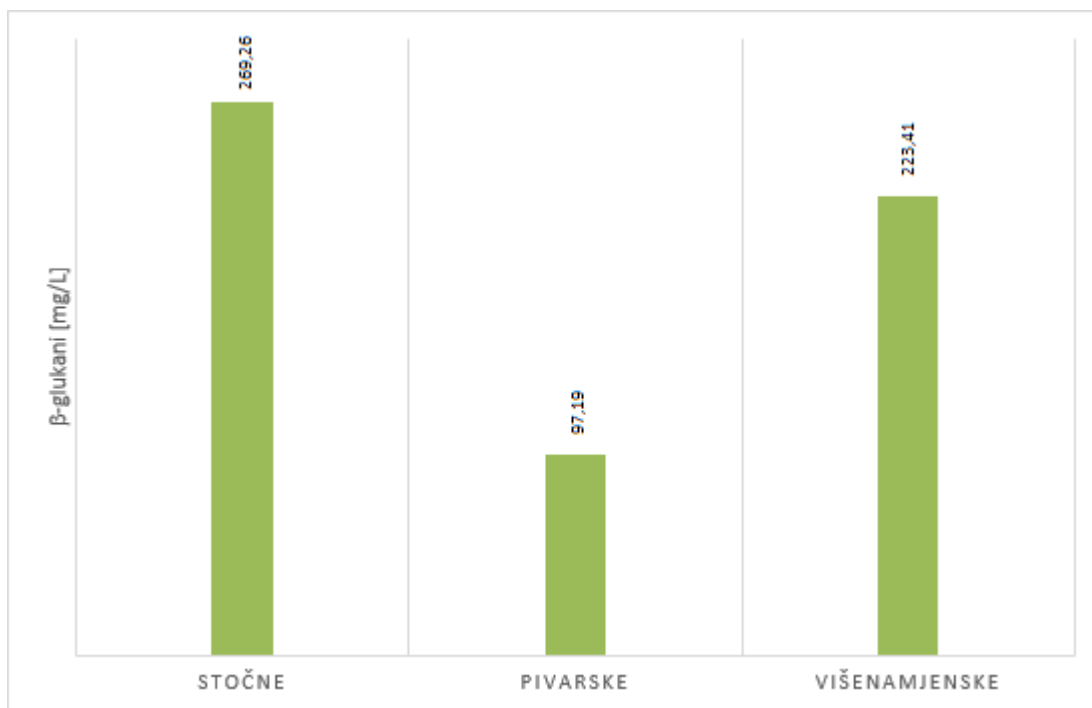
Količina β -glukana u sladovini se kreće od 80,7 mg/L (Pivarac) do 334,95 mg/L (Gazda) (**Slika 13**). Možemo uočiti da Pivarac (pivarska sorta, jari dvoredni) koji je u ječmu imao sadržaj β -glukana 4,8 g/100 g s.t. (jedan od uzoraka koji je imao veći sadržaj β -glukana) nakon procesa slađenja i ukomljavanja ima najmanju vrijednost β -glukana. Sadržaj β -glukana u sladu kod uzoraka Stribor, Tiffany i Pivarac je bio najmanji, međutim u sladovini je uzorak Stribor postigao više vrijednosti od očekivanih.

Sve jare sorte (osim sorte Matej) daju sladovine sa preporučenom koncentracijom β -glukana 220 mg/L (i niže). Kontrolne sorte (osim sorte Sandra 237,59 mg/L) također zadovoljavaju preporučenu koncentraciju β -glukana. Od ozimih sorti preporučenu koncentraciju β -glukana imaju samo sorte Barun i Osk.6.61-4-13.

Pivarske sorte u prosjeku imaju najmanji sadržaj β -glukana (97,19 mg/L), dok stočne sorte imaju najveću vrijednost (269,26 mg/L) (**Slika 14**).

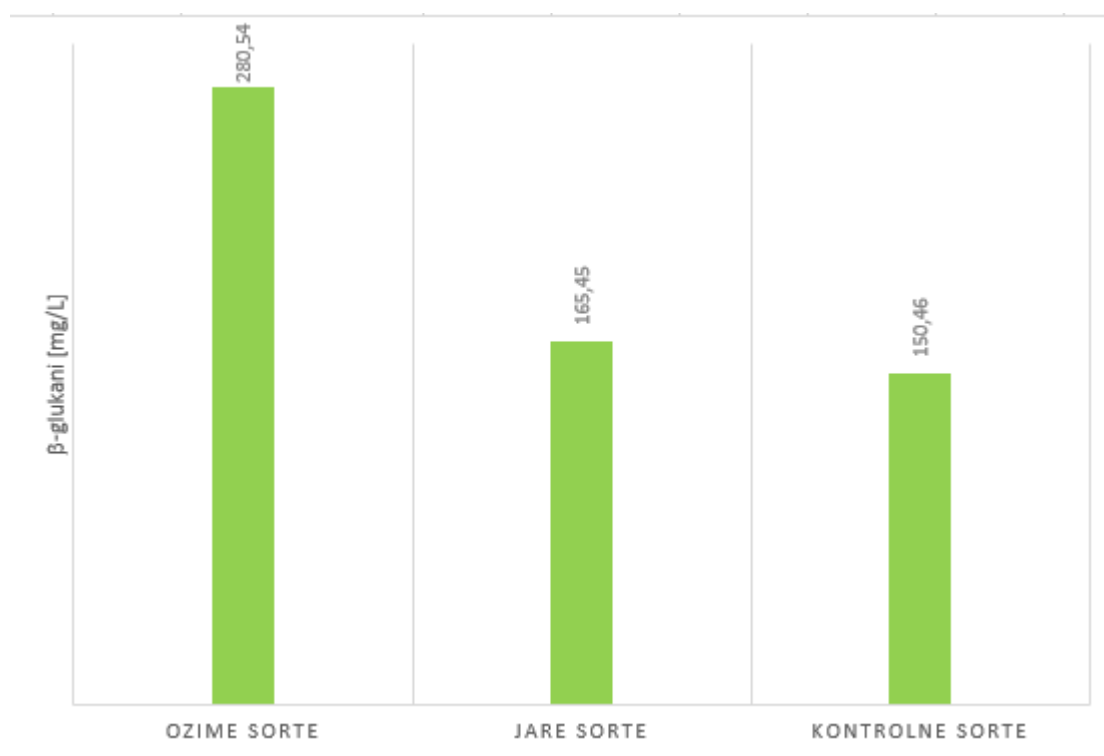


Slika 13 Udio β -glukana u sladovini pojedinih uzoraka



Slika 14 Prosječni udio β-glukana u stočnim, pivarskim i višenamjenskim sortama sladovine

Ozime sorte su pokazale najveći sadržaj β-glukana (280,54 mg/L) kao što je bio slučaj i kod slada, međutim u sladu su najnižu prosječnu vrijednost imale jare sorte, dok u sladovini najnižu prosječnu vrijednost imaju kontrolne sorte (150,46 mg/L) (**Slika 15**).

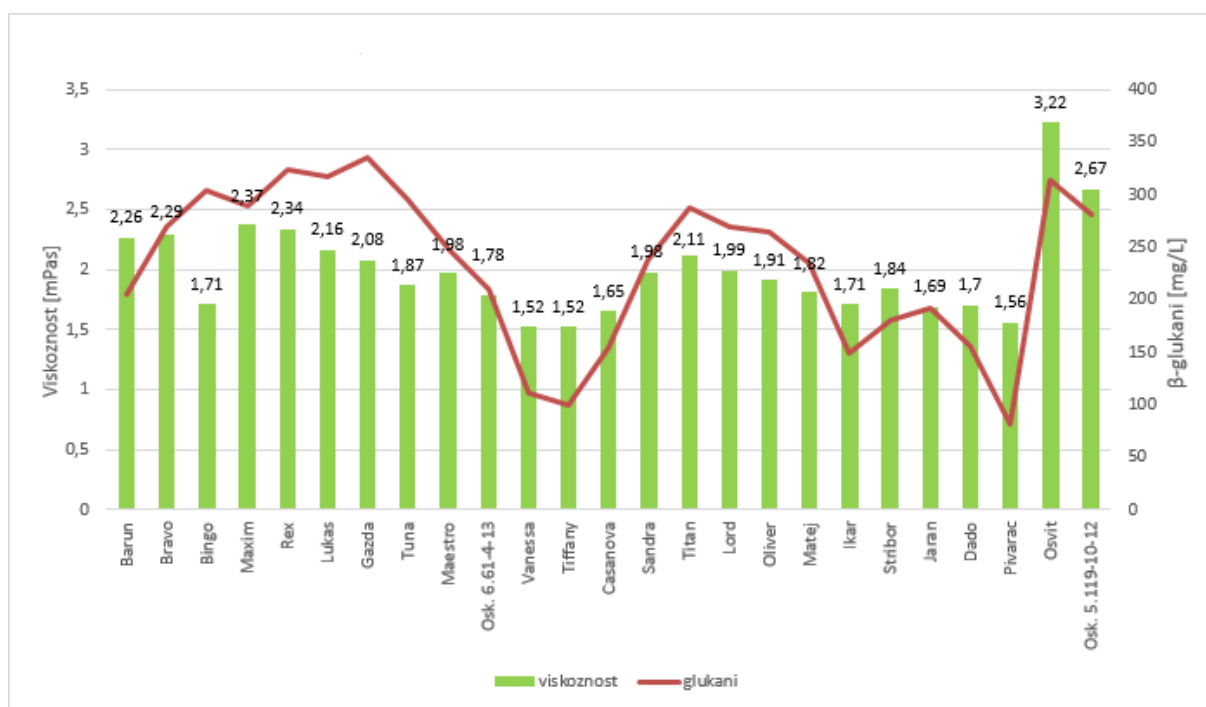


Slika 15 Prosječni udio β-glukana u uzorcima sladovine s obzirom na vrijeme sjetve

Većina β-glukana sadrži uzastopne β(1,4) veze koje su razdvojene sa β(1,3) vezama. Međutim postoji dokaz i o uzastopnim β(1,3) vezama, a u nekim slučajevima postoji i do 10 uzastopnih β(1,4) veza. Nepravilno povezan uzorak daje asimetričan oblik molekule što spriječava intermolekularnu povezanost rezultirajući visokim stupnjem topljivosti. To, zauzvrat, djeluje na polisaharide da daju visoku viskoznost sladovine praveći probleme u procesu vrenja (Vis i Lorenz, 1997.).

Hwang i Lorenz (1986.) ispitali su 18 sorti ječma uzgajanih na 10 različitih mjesta berbe u SAD-u i Kanadi. Koristili su viskoznost ekstrakta kao neizravan indikator sadržaja β-glukana. Također su zaključili da na pojavu viskoznosti ekstrakta imaju veći utjecaj uvjeti rasta nego uzgoja.

Iz rezultata dobivenih u ovom radu možemo vidjeti kako su viskoznost sladovine i sadržaj β-glukana u sladovini u proporcionalnom odnosu (**Slika 16**).



Slika 15 Ovisnost viskoznosti i udjela β-glukana u sladovini

5. ZAKLJUČCI

1. Kontrolni uzorci su postigli najbolje rezultate viskoznosti. Posebno se ističe sorta Tiffany i Vanessa.
2. Najveće razlike u usporedbi sadržaja β -glukana u ječmu i sladu su uočene kod tri jare sorte: Dado, Ikar i Pivarac (klasificirana kao pivarska sorta). Iz razlike sadržaja β -glukana moglo bi se pretpostaviti da su tri prethodno navedene jare sorte ostvarile najveću aktivnost enzima β -glukanaze.
3. Možemo uočiti da Pivarac (pivarska sorta, jari dvoredni), koji je u ječmu imao sadržaj β -glukana među najvišim, nakon procesa slađenja i ukomljavanja ima najmanju vrijednost β -glukana.
4. Pivarske sorte u prosjeku imaju najmanji sadržaj β -glukana u sladovini, dok stočne sorte imaju najveću vrijednost.
5. Sve jare sorte (osim sorte Matej) daju sladovine sa preporučenom koncentracijom β -glukana 220 mg/L (i niže). Kontrolne sorte (osim sorte Sandra 237,59 mg/L) također zadovoljavaju preporučenu koncentraciju β -glukana. Od ozimih sorti preporučenu koncentraciju β -glukana imaju samo sorte Barun i Osk.6.61-4-13.

6. LITERATURA

Akar T, Avici M, Dusunceli F: Barley: Post-Harvest Operations. Food and Agriculture Organization (FAO) of the United Nations, The Central Research Institute for Field Crops, Ankara, 2004.

Analytica EBC. V. Fachverlang Hans Carl, Nürnberg, 1998.

Enari TM, Sopanen T: Mobilisation of endosperm reserves during germination of barley. *Journal of the Institute of Brewing*, 92:25-31, 1986.

Gaćeša S: Tehnologija slada sa sirovinama za tehnologiju piva. Poslovna zajednica industrije piva i slada Jugoslavije, Beograd, 1979.

Gagula G: Određivanje udjela β -glukana u domaćim sortama pivarskog ječma, specijalistički rad, Prehrambeno-tehnološki fakultet Osijek, 2013.

Hwang YS, Lorenz K: Quality of malting barleys grown at different locations in the United States and Canada. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 49:1313-1320, 1985.

Jadhav SJ, Lutz SE, Ghorpade VM, Salunkje DK: Barley: chemistry and value-added processing. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 38 (2), 123-171, 1998.

Jiang GS, Vasanthan T: MALDI-MS and HPLC quantification of oligosaccharides lichenase-hydrolyzed water-soluble β -glucan from ten barley varieties. *J. Agric Food Chem*, 48 (8), 3305-3310, 2000.

Kirkman MA, Shewry PR, Mifflin BJ: The effect of nitrogen nutrition on the lysine content and protein composition of barley seeds. *J Sci Food Agric*, 33:115-127, 1982.

Kovačević J, Lalić A, Martinčić J, Šimić I, Horvat J, Juzbašić M, Kelečnji Z, Kuti I, Lešić L, Marjanović I, Mužar Z, Nikolić B: Mogućnosti proizvodnje ječma i slada u Republici -Hrvatskoj. *Poljoprivredne aktualosti*, 30:457-469, 1994.

Krstanović V, Lalić A, Kosović I, Velić N, Mastanjević K: A Survey of Total β -glucan Content in Croatian Barley Varieties. *Cereal Research Communications*, 44:650-657, 2016.

Kunze W: Technologie Bauer und Malzer. 7. völlig neubearbeitete Auflage, VLB Berlin, 1994.

Lalić A, Kovačević J: Oplemenjivanje ječma za potrebe sladarstva i stočarstva u Republici Hrvatskoj. *Poljoprivreda*, 3:31-45, 1997.

Lásztity R: The chemistry of barley. U *Cereal Chemistry*. R. Lásztity (ur.), Akadémiai Kiadó, Budapest, str. 168-191, 1999.

Lehtonen M, Aikasalo R: Pentosans in barley varieties. *Cereal Chem*, 64 (2), 133-134, 1987a.

Magdić M: Citolitička razgradnja zrna tijekom slađenja različitih sorti skupina ječma. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2017.

- Mansfeld R: Das morphologische System der Saatgerste, *Hordeum vulgare* L. s.l (The *morphological* system of cultivated barley, *Hordeum vulgare* L. s.l.). *Der Züchter*, 20:8-24, 1950.
- Marić V: Proizvodnja ječmenog slada. U *Biotehnologija i Sirovine*. Marić V. (ur.), Poljoprivredni fakultet, Osijek i Agronomski fakultet, Zagreb, str. 155-180, 2000.
- Marić V: Tehnologija piva. Veleučilište u karlovcu 39-40, 2009.
- MEBAK, Methodensammlung der Mitteleuropäischen Analysenkommission. U *Raw Materials: Barley, Adjuncts, Malt, Hops and Hop Products*. von Fritz J. (ur.), Selbstverlag der MEBAK, Freising-Weihenstephan, München, 2011.
- Megazyme: Mixed-linkage beta-glucan kit, Ireland, 2017.
- Mohaček M: Pivovarstvo, Priručnik za izobrazbu stručnih kadrova, Ministarstvo industrije N. R.Hrvatske, Zagreb, 1948.
- Pržulj N, Momčilović V: Oplemenjivanje ječma na prinos i kvalitetu. *Glasnik Zaštite Bilja*, 29:49-57, 2006.
- Pržulj N, Momčilović, V, Đurić V: Dobar tehnološki kvalitet i stabilan prinos – glavni pravi oplemenjivanja ječma u Novom Sadu. Naučni institut za ratarstvo i povrtarstvo, Zbornik radova 33:151-162, 2000.
- Schuster K, Weinfurtner F, Narziss L: Die Technologie der Würzebereitung, (1985.). Tehnologija proizvodnje sladovine (prijevod Gaćeša S). Posl. zajed. ind. piva i slada Jug, 15-18, 25-33, 236-243, 1988.
- Stepanović M: Utjecaj temperature skladištenja na raspodjelu zearalenona u frakcijama slada. *Diplomski rad*. Prehrambeno-tehnološki fakultet, Osijek, 2014.
- Šimić G, Lalić A, Hovrat D, Abičić I, Beraković I: β -glucan content and β -glucanase activity of winter and spring malting barley cultivars. *Acta alimentaria*, 44:542-548, 2015.
- Šimić G: Utjecaj genotipa i okolišnih uvjeta na parametre sladarske kakvoće ozimog ječma (*Hordeum vulgare* L.), Disertacija, Poljoprivredni institut Osijek, 2009.
- Štefanić K, Marić V: Pivarski priručnik. Jugoslavensko udruženje pivovara, Beograd, 1990.
- Vis RB, Lorenz K: β -Glucans: Importance in Brewing and Methods of Analysis, *Department of Food Science and Human Nutrition*, USA, 1996.
- VitaminPROS <http://www.vitaminpros.com/barley-beta-glucan.htm> (pristupljeno rujan, 2018.)
- Wang J, Zhang G, Chen J, Wu F: The changes of β -glucan content and β -glucanase activity in barley before and after malting and their relationships to malt qualities. *Food Chemistry*, 86:223-228, 2004.

Yamashita H, Hayse F, Kato H: β -glucanases in malt that form insoluble materials. *Agricultural and Biological Chemistry*, 49:1313-1320, 1985.

Zhang G, Wang J, Chen J: Analysis of β -glucan content in barley cultivars from different locations of China. *Food Chemistry*, 79:251-254, 2002.

